บทที่ 3

รูปแบบของการวิจัย (Research Design)

การวิจัยเชิงพรรณาระยะยาว (Longitudinal Descriptive study) เป็นระยะเวลา 1 ปี

<u>ระเบียบวิธีวิจัย</u> (Research methodology)

3.1 ประชากรและตัวอย่าง (Population and Sample)

3.1.1 ประชากรเป้าหมาย

ผู้ป่วยเด็กโรคธาลัสซีเมียที่มีผลเลือดตรวจพบ HGV-RNA positive ที่มารับการรักษาที่ฝ่ายกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

3.1.2 กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1) ผู้ป่วยเด็กโรคธาลัสซีเมีย อายุตั้งแต่ 1 -15 ปี

2) มีผลเลือดตรวจพบ HGV-RNA positive

3.1.3 กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

ผู้ป่วยเด็กโรคธาลัสซีเมียที่มีผลเลือดตรวจพบ HGV-RNA positive ที่ไม่สามารถมาติดตามการรักษา

3.1.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลชนิดนับ และเป็นงานวิจัยประเภทที่ต้องการประมาณค่าการศึกษาในคนกลุ่มเดียว จึงใช้สูตรคำนวณหา ขนาดตัวอย่างคือ $n = Z\alpha^2 PQ/d^2$

จากข้อมูลที่ได้จากการ review literatures อัตราการเกิด HGV-RNA negativeในผู้ป่วยที่เคยมี HGV-RNA positive เป็น 16% ยอมให้ความคลาดเคลื่อนมีได้ไม่เกิน10% กำหนดระดับความเชื่อมั่นในการสรุปข้อมูล = 80%

$Z\alpha = Z_{0.2/2}$	=	1.28 (two tail)
n	=	$Z\alpha^2 PQ/d^2$
P	=	อัตราการเกิดเหตุการณ์ = 0.16
Q	=	1 - 0.16
d	=	acceptable error = 0.1
n	=	$(1.28)^2 (0.16)(0.84)/(0.1)^2$
n	=	22 คน

3.2 การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ที่มีผลเลือดตรวจพบ HGV-RNA ที่มารับการให้เลือดในคลินิกโรคเลือด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จะได้รับการเก็บข้อมูลดังต่อไปนี้

3.2.1 ข้อมูลพื้นฐาน : ชื่อ, เพศ, อายุ, หมายเลขบัตรประจำตัวผู้ป่วย

3.2.2 การวินิจฉัยโรค , จำนวนครั้งของการได้รับเลือด, ผลการตรวจ HGV - RNA

3.2.3 ผู้ป่วยจะได้รับการเจาะเลือดเพื่อการจองเลือด และเลือดอีกส่วนหนึ่งประมาณ 3 มล. เพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการดังนี้

การตรวจ HGV-RNA (RT- PCR)

1.) HGV-RNA โดยใช้ guanidine method

<u>วิธีปฏิบัติการ</u>: การสกัดRNA โดยการใช้ guanidine method ต่อมา denature ด้วยอุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที ตัวอย่างRNAจะถูก reverse-transcribed ไปเป็น cDNA ในปริมาณทั้งหมด 20 µl โดยใช้ Murine Leukemia Virus (MuLv) reverse Transcriptase 50 U (Perkin Elmer) RNA 10 µl, KCl 50 mM, Tris-HCL pH 8 10 mM, dNTPs 400 µM, RNAase inhibitor 10 U และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง HGV-RNA จะถูกตรวจด้วย nested PCR โดยใช้ primer 2 คู่ในตำแหน่ง 5′ untranslated region (UTR) ของ GBV-C

ขั้นตอนการ amplification

<u>ขั้นแรก</u>: ตัวอย่าง cDNA 5 µl จะถูก amplify ใน reaction volume 50 µl ที่ประกอบด้วย KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, Tris-HCl pH 8 10 mM, d NTP 200 µM, Ampli Taq DNA Polymerase 1 U (Perkin Elmer Cetus), ในแต่ละส่วนของ outer sense primer 0.8 µM ที่ตำแหน่ง 108 ซึ่งมีลำดับการเรียงตัว 5′AGG TGG TGG ATG GGT GAT 3′ และส่วนของ outer anti-sense primer ที่ตำแหน่ง 531 ซึ่งลำดับการเรียงตัว 5′TGC CAC CCG CCC TCA CCC GAA 3′ $MgCl_2$ 1.5 mM ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้น 30 cycles ที่อุณหภูมิ 94°C ในเวลา 36 วินาที ที่อุณหภูมิ 55°C ในเวลา 42 วินาที และที่อุณหภูมิ 72°C ในเวลา 96 วินาที

<u>ขั้นที่สอง</u>: Reaction 20 µl จะผ่านขั้นตอนเดียวกับขั้นตอนที่ 1 โดยใช้ PCR product จากขั้นที่ 1 จำนวน 1µl ในส่วนของ inner sense primer ที่ตำแหน่ง 134 จะมีลำดับการเรียงตัว 5′ TGG TAG GTC GTA AAT CCC GGT 3′ และส่วนของ antisense primer ที่ตำแหน่ง 476 จะมี

ลำดับการเรียงตัว 5′ GGR GCT GGG TGG CCY CAT GCWT 3′ (R = A หรือ G, W = A หรือ T, Y = C หรือ T) ในส่วนของ primers ข้างต้น จะถูกนำมาใช้ในขั้นที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย amplication 30 cycles ผลิตผลที่ผ่านการขยายแล้ว (amplified product) 10 µl จะถูกแยกส่วน โดยใช้ 2% Nusieve gel electrophoresis ใน Tris borate buffer ที่ 120 volt ในเวลา 50 นาที และสามารถมองเห็นโดย UV florescence ภายหลังจาก stain ด้วย ethidium bromide product band จะแสดง 421 base pairs ในการทำ amplification ขั้นที่ 1 และ 343 base pairs ในขั้นที่ 2

3.2.4 ผู้ป่วยจะได้รับการติดตามเป็นระยะเวลา อย่างน้อย 1 ปี โดยมีการติดตามเพื่อตรวจเลือดหา HGV-RNA ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว

3.3. <u>การรวบรวมข้อมูล</u> (Data collection)

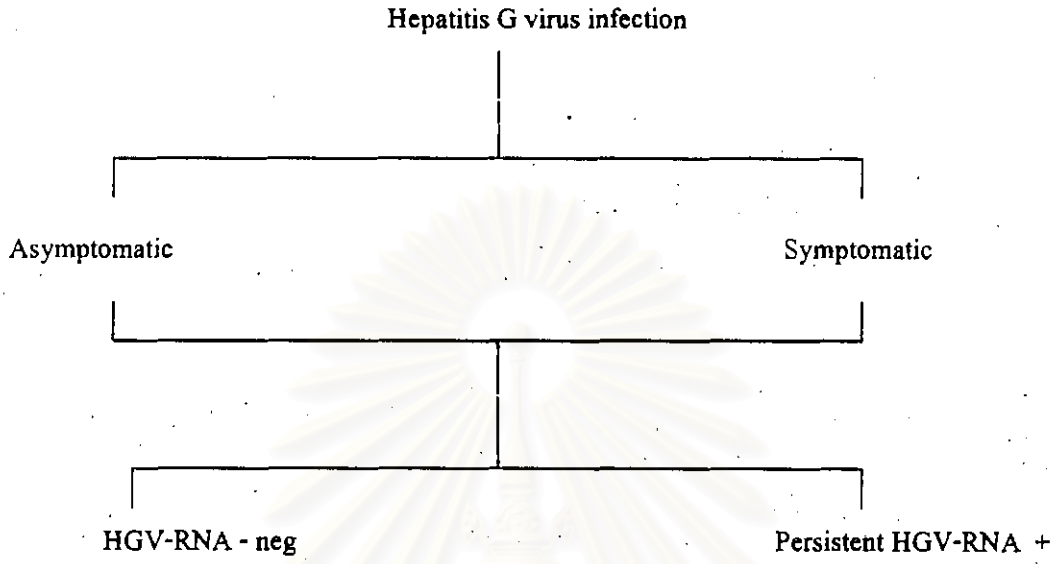
ข้อมูลของผู้ป่วยจะได้รับการบันทึกในแบบฟอร์ม ซึ่งประกอบด้วยข้อมูลดังต่อไปนี้

1. ข้อมูลพื้นฐาน: ชื่อ, เพศ, อายุ, หมายเลขบัตรประจำตัวผู้ป่วย
2. การวินิจฉัยโรค, จำนวนครั้งของการได้รับเลือด
3. ผลการตรวจเลือด HGV-RNA

3.4 <u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u> (Data analysis)

- ข้อมูลที่ได้จะถูกวิเคราะห์และนำเสนอเป็นตารางและสรุปข้อมูลในลักษณะของร้อยละ (Percentage)
- ใช้ Fisher exact test ดูความแตกต่างระหว่างจำนวนครั้งของการได้รับเลือด กับการหายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ จี และดูความแตกต่างระหว่าง เพศกับการหายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ จี
- ใช้ Kaplan Meier plot ดูโอกาสที่ผู้ป่วยจะหายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ จี เมื่อติดตามผู้ป่วยไปในระยะเวลาที่นานขึ้น และ โอกาสที่ผู้ป่วยจะหายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ จี เมื่อติดตามผู้ป่วยไปในระยะเวลาที่นานขึ้น เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วย 2 กลุ่มคือ ผู้ป่วยที่ได้รับเลือด < 40 ครั้ง กับกลุ่มที่ได้รับเลือด > 40 ครั้ง

<u>กรอบแนวความคิดในการวิจัย</u> (Conceptual Framework)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย